

TRANSLATION

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference 04 | FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA416 | |
| International application No. PCT/EP2004/014337 | International filing date (day/month/year) 16.12.2004 | Priority date (day/month/year) 18.12.2003 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/77, C12N9/02, C12N1/21 | | |
| Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT | | |

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:

a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of _____ sheets, as follows:

☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).

☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.

b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

☒ Box No. I Basis of the report

☐ Box No. II Priority

☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

☐ Box No. IV Lack of unity of invention

☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

☐ Box No. VI Certain documents cited

☐ Box No. VII Certain defects in the international application

☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

| | |
|---|-----------------------------------|
| Date of submission of the demand | Date of completion of this report |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/EP2004/014337

Box No. 1 Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rule 12.3 and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4)
- ☐ international preliminary examination (Rule 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:
- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
- pages 1-90 _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
- nos. 1-42 _____ as originally filed/furnished
- nos.* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
- nos.* _____ received by this Authority on _____
- nos.* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
- sheets 1-54 _____ as originally filed/furnished
- sheets* _____ received by this Authority on _____
- sheets* _____ received by this Authority on _____
- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/EP2004/014337

Box No. V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 8-48 | YES |
| | Claims | 1-7, 49-54 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 8-48 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-54 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

Reference is made to the following documents:

- D1: MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability"
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 183, No. 4, February 2001 (2001-02), pages 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193
- D2: WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4 January 2001 (2001-01-04).

1. Novelty (PCT Article 33(2))

The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(1) because the subject matter of claims 1-7 and 49-54 is not novel within the meaning of PCT Article 33(2).

Document D1 discloses the nucleic acid sequence of the sodA gene of *Corynebacterium melassecola* and the amino acid sequence of the coded enzyme derived therefrom (D1, figure 3). Furthermore, document D1 identifies the sodA promoter, including its characteristic elements (ribosome

Box No. V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

binding site, conserved binding sites for transcription factors in the positions -10 and -35). The sequences having the SEQ ID NOs: 1, 2 and 42-44, disclosed in the present application, are contained in the sequence disclosed in document D1. The use of a promoter for the transcription of genes is implicitly disclosed in document D1, since promoters are defined in terms of their regulating function during gene transcription.

2. Inventive step (PCT Article 33(3))

The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(1) because the subject matter of claims 8-48 does not involve an inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).

Document D1 is considered the prior art closest to the subject matter of claim 8. Document D1 suggests the use of the disclosed *sodA* promoter in combination with a (heterologous) reporter gene (page 1292, left-hand column, paragraph 2). It was therefore obvious to a person skilled in the art to use the *sodA* promoter for the expression of heterologous genes and to produce correspondingly genetically modified micro-organisms.

Dependent claims 9-17 contain no additional features which go beyond the routine technical modification of the subject matter of claim 8.

Claims 8-17 are not inventive (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/EP2004/014337

Box No. V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

Claims 18, 19, 21, 22, 36, 37 and 39-47 claim the use of the promoter described above for influencing different biosynthesis pathways and enzymes of the amino acid biosynthesis pathway. Document D2 is the closest prior art. It describes ways of influencing biosynthesis pathways in coryne bacteria through the use of modified promoter regions and/or regulatory elements (pages 9-16 and page 53, lines 26-31). The difference with respect to the prior art document D2 lies in the use of the *sodA* promoter. The resulting problem can be understood to be the provision of a promoter for the overexpression of enzymes of biosynthesis pathways. However, this problem was only partly solved by the present application, since an overexpression was demonstrated for only two genes in *C. glutamicum* (*lysC* and *metA*). Since the regulation of genes and in particular the strengths of promoters differs from gene to gene, it is not possible to conclude from the two examples described to all the other biosynthesis pathways or enzymes listed in the claims. The above problem can therefore not be considered solved as regards the regulation of the remaining genes, and hence an inventive step is not recognized. Since document D1 already suggests the use of the *sodA* promoter for the expression of heterologous sequences (for example, reporter genes), a generalization of this kind not having a surprising or unexpected effect cannot be considered inventive.

Claims 18-48 are not inventive (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/EP2004/014337

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. 1, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment* on _____
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:



* If item 4 in Box No. 1 applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

(Kapitel II des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens)

| | | |
|---|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000055185 | WEITERES VORGEHEN siehe Formblatt PCT/PEA/416 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/014337 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16.12.2004 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 18.12.2003 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/77, C12N9/02, C12N1/21 | | |
| Anmelder BASF AKTIENGESSELLSCHAFT et al. | | |
| <p>1. Bei diesem Bericht handelt es sich um den internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, der von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde nach Artikel 35 erstellt wurde und dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt wird.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p>3. Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; diese umfassen</p> <p>a. <input type="checkbox"/> (an den Anmelder und das Internationale Büro gesandt) insgesamt Blätter; dabei handelt es sich um</p> <p><input type="checkbox"/> Blätter mit der Beschreibung, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit Berichtigungen, denen die Behörde zugestimmt hat (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften).</p> <p><input type="checkbox"/> Blätter, die frühere Blätter ersetzen, die aber aus den in Feld Nr. 1, Punkt 4 und im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde eine Änderung enthalten, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht.</p> <p>b. <input checked="" type="checkbox"/> (nur an das Internationale Büro gesandt) insgesamt (bitte Art und Anzahl der elektronischen Datenträger(s) angeben), der/die ein Sequenzprotokoll und/oder die dazugehörigen Tabellen enthält/enthalten, nur in computerlesbarer Form, wie im Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll angegeben (siehe Abschnitt 802 der Verwaltungsvorschriften).</p> | | |
| <p>4. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. I Grundlage des Bescheids</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. II Priorität</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p> | | |
| Datum der Einreichung des Antrags 13.04.2005 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.11.2005 | |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | | Bevollmächtigter Bediensteter Rutz, B Tel. +49 89 2399-7828  |

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/014337

Feld Nr. I Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bericht auf der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
 - ☐ Der Bericht beruht auf einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für folgenden Zweck eingereicht worden ist:
 - ☐ internationale Recherche (nach Regeln 12.3 und 23.1 b))
 - ☐ Veröffentlichung der internationalen Anmeldung (nach Regel 12.4)
 - ☐ internationale vorläufige Prüfung (nach Regeln 55.2 und/oder 55.3)
2. Hinsichtlich der **Bestandteile*** der internationalen Anmeldung beruht der Bericht auf (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt*):

Beschreibung, Seiten

1-90 in der ursprünglich eingereichten Fassung

das Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten

1-42 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-54 in der ursprünglich eingereichten Fassung

☒ einem Sequenzprotokoll und/oder etwaigen dazugehörigen Tabellen - siehe Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

3. ☐ Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:
 - ☐ Beschreibung: Seite
 - ☐ Ansprüche: Nr.
 - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):
4. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der diesem Bericht beigelegten und nachstehend aufgelisteten Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).
 - ☐ Beschreibung: Seite
 - ☐ Ansprüche: Nr.
 - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
 - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
 - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

* Wenn Punkt 4 zutrifft, können einige oder alle dieser Blätter mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT
ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT**

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/014337

Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---------------------------|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 8-48 |
| | Nein: Ansprüche 1-7,49-54 |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche - |
| | Nein: Ansprüche 8-48 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche 1-54 |
| | Nein: Ansprüche - |

2. Unterlagen und Erklärungen (Regel 70.7):

siehe Beiblatt

Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

Fortsetzung von Feld Nr. I, Punkt 2:

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bescheid auf folgender Grundlage erstellt worden:
 - a. Art des Materials
 - ☒ Sequenzprotokoll
 - ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
 - b. Form des Materials
 - ☒ in schriftlicher Form
 - ☒ in computerlesbarer Form
 - c. Zeitpunkt der Einreichung
 - ☒ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
 - ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht
 - ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche und/oder Prüfung eingereicht
 - ☐ bei der Behörde als Änderung eingegangen am
2. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 183, Nr. 4, Februar 2001 (2001-02), Seiten 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193

D2: WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESSELLSCHAFT) 4. Januar 2001 (2001-01-04)

1. Neuheit (Art. 33(2) PCT)

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 49-54 im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu ist.

Dokument D1 offenbart die Nukleinsäuresequenz des sodA Gens aus *Corynebacterium melassecola* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des kodierten Enzyms (D1, Fig. 3). Weiterhin identifiziert D1 den sodA Promotor inklusive seiner charakteristischen Elemente (Ribosombindungsstelle, konservierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren an den Positionen -10 und -35). Die in vorliegender Anmeldung offenbarten Sequenzen mit den SEQ ID NOs: 1, 2 und 42-44 sind in der in D1 offenbarten Sequenz enthalten. Die Verwendung eines Promotors zur Transkription von Genen ist implizit in D1 offenbart, da Promotoren durch ihre regulierende Funktion bei der Transkription von Genen definiert sind.

2. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 8-48 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von Artikel 33(3) beruht.

Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 8 angesehen. D1 schlägt die Verwendung des offenbarten sodA Promotors in Verbindung mit einem (heterologen) Reportergen vor (S. 1292, linke

Spalte, 2. Absatz). Es war daher offensichtlich für den Fachmann, den *sodA* Promotor zur Expression von heterologen Genen zu verwenden und entsprechend genetisch modifizierte Mikroorganismen herzustellen.

Die abhängigen Ansprüche 9-17 enthalten keine zusätzlichen Merkmale, die über routinemässige technische Änderungen des Gegenstands des Anspruchs 8 hinausgehen.

Ansprüche 8-17 sind nicht erfinderisch (Art. 33(3) PCT)

In den Ansprüchen 18, 19, 21, 22, 36, 37 und 39-47 wird die Verwendung des beschriebenen Promotors zur Beeinflussung verschiedener Biosynthesewege und Enzyme aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren beansprucht. D2 stellt den nächsten Stand der Technik dar. Es beschreibt die Beeinflussung von Biosynthesewegen in *Corynebakterien* durch die Verwendung von veränderten Promotorregionen und/oder regulatorischen Elementen (S. 9-16 und S. 53, Z. 26-31). Der Unterschied zum nächsten Stand der Technik D2 liegt in der Verwendung des *sodA* Promotors. Das daraus resultierende Problem kann als die Bereitstellung eines Promotors zur Überexprimierung von Enzymen aus Biosynthesewegen formuliert werden. Dieses Problem wurde allerdings nur teilweise durch die vorliegende Anmeldung gelöst, da eine Überexpression nur für zwei Gene in *C. glutamicum* gezeigt wurde (*lysC* und *metA*). Da die Regulation von Genen und insbesondere die Stärke von Promotoren sich von Gen zu Gen unterscheidet, kann von den beiden beschriebenen Beispielen nicht auf alle anderen in den Ansprüchen aufgeführten Biosynthesewege oder Enzyme geschlossen werden. Für die Regulation der übrigen Gene kann das obengenannte Problem folglich nicht als gelöst angesehen werden und ein erfinderischer Schritt ist daher zu verneinen. Da D1 die Verwendung des *sodA* Promotors zur Expression von heterologen Sequenzen (z.B. Reportergene) bereits nahelegt, kann eine solche allgemeine Verwendung, d.h. ohne einen überraschenden oder unerwarteten Effekt, nicht als erfinderisch angesehen werden.

Ansprüche 18-48 sind nicht erfinderisch (Art. 33(3) PCT).